



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C07K 14/55, 14/535, 14/035, 14/82	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/10642 (43) Date de publication internationale: 11 avril 1996 (11.04.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01274 (22) Date de dépôt international: 2 octobre 1995 (02.10.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/11846 4 octobre 1994 (04.10.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DENEFFLE, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés-de-Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 58, boulevard Saint-Denis, F-92400 Courbevoie (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: ADENOVIRUS-DERIVED VIRAL VECTORS HAVING TWO THERAPEUTIC GENES: SUICIDE AND IMMUNOPOTENTIATING (54) Titre: ADENOVIRAUX COMPRENANT DEUX GENES THERAPEUTIQUES: SUICIDE ET IMMUNOSTIMULANT (57) Abstract <p>Novel adenovirus-derived viral vectors, preparation thereof, and use thereof in gene therapy. In particular, defective recombinant adenoviruses including two therapeutic genes, i.e. a suicidal gene and an immunopotentiating or tumour-suppressor gene, are disclosed.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux dérivés des adénovirus, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne plus particulièrement des adénovirus recombinants défectifs comprenant deux gènes thérapeutiques, le premier étant un gène suicide et le second un gène immunostimulant ou un gène suppresseur de tumeurs.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Adénoviraux comprenant deux gènes thérapeutiques: suicide et immuno-stimulant

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques contenant lesdits vecteurs viraux. Plus particulièrement, la présente invention concerne des adénovirus recombinants comme vecteurs pour la thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Parmi ces virus, les adénovirus présentent certaines propriétés intéressantes pour une utilisation en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à leur extrémité, une séquence d'encapsidation, des gènes précoces et des gènes tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont les gènes E1 (E1a et E1b), E2, E3 et E4. Les principaux gènes tardifs sont les gènes L1 à L5.

Compte tenu des propriétés des adénovirus mentionnées ci-dessus, ceux-ci ont déjà été utilisés pour le transfert de gènes in vivo. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes (β -gal, OTC, α -

1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de répllication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés des régions E1 (E1a et/ou E1b) et éventuellement E3 au niveau desquelles est insérée une séquence d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161).

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs dérivés des adénovirus particulièrement efficaces pour des applications de thérapie génique. Plus particulièrement, la présente invention découle en partie de la mise en évidence qu'il est possible d'incorporer plusieurs gènes d'intérêt dans des adénovirus, et d'obtenir une expression importante de ces différents gènes dans les cellules infectées. La présente invention découle également de la construction de vecteurs adénoviraux capables d'incorporer plusieurs gènes thérapeutiques dans des conditions permettant leur expression optimale. Elle découle encore de la mise en évidence d'un effet synergique des vecteurs de l'invention, lié à la co-expression, dans la même cellule cible, de gènes thérapeutiques complémentaires. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux présentant des propriétés thérapeutiques tout à fait avantageuses en vue de leur utilisation en thérapie génique ou cellulaire. En particulier, les vecteurs de l'invention présentent des propriétés tout à fait avantageuses pour une utilisation dans le traitement des pathologies présentant des épisodes d'hyperprolifération cellulaire (cancers, resténose, etc).

Un premier objet de la présente invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant deux gènes thérapeutiques, dans lequel l'un des gènes thérapeutiques est un gène suicide et l'autre est un gène immunostimulant ou suppresseur de tumeurs. La demanderesse a en effet montré que la co-expression simultanée de tels gènes dans une même cellule cible produisait un effet thérapeutique anti-tumoral particulièrement avantageux, bien supérieur à l'effet obtenu au moyen de ces gènes seuls ou introduits séparément.

Les gènes thérapeutiques utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg.

Les deux gènes thérapeutiques incorporés dans les vecteurs adénoviraux selon la présente invention peuvent être agencés de différentes manières.

Ils peuvent tout d'abord constituer une entité transcriptionnelle unique. Dans cette configuration, les deux gènes sont contigus, disposés sous le contrôle d'un promoteur unique, et donnent lieu à un ARN prémessager unique. Cette disposition est avantageuse puisqu'elle permet d'utiliser un seul promoteur transcriptionnel.

Les deux gènes thérapeutiques peuvent également être placés sous le contrôle de promoteurs transcriptionnels séparés. Cette configuration permet d'obtenir des niveaux d'expression supérieurs, et offre un meilleur contrôle de l'expression des gènes. Dans ce cas, les deux gènes thérapeutiques peuvent être insérés dans la même orientation ou dans les orientations opposées, dans un même site du génome de l'dénovirus ou en des sites différents.

Comme gène suicide, on utilise préférentiellement les gènes dont le produit d'expression confère à la cellule une sensibilité à un agent thérapeutique. Plus préférentiellement, le gène suicide est le gène de la thymidine kinase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à certains agents thérapeutiques tels le ganciclovir ou l'acyclovir. La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex est capable de phosphoryler les analogues de nucléosides tels que l'acyclovir et le ganciclovir. Ces molécules modifiées peuvent être incorporées dans une chaîne d'ADN en cours d'élongation, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ADN, entraînant la mort de la cellule (F.L. Moolten, Cancer Res. 46 (1986) 5276). Cette stratégie permet ainsi d'éliminer spécifiquement les cellules exprimant le gène suicide. De plus, la synthèse d'ADN étant la cible de la toxicité, seules les cellules en cours de division sont affectées.

Plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès humain (hTK HSV-1). La séquence de ce gène a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight et al., Nucleic Acid. Res. 8 (1980) 5931). Il est également possible d'utiliser des dérivés de cette séquence présentant une plus grande spécificité de substrat ou une meilleure activité kinase. De tels dérivés peuvent en particulier être obtenus par mutagenèse au niveau du site de liaison comme décrit précédemment (Balasubramaniam et al., J. Gen. Virol. 71 (1990) 2979; Munir et al., JBC 267 (1992) 6584).

Il est également possible d'utiliser le gène de la cytosine désaminase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à la 5-fluoro-

cytosine (5-FC) ou des nitroréductases qui confèrent aux cellules mammifères une sensibilité aux produits nitroaromatiques (J. Biol. Chem. 266 (1991) 4126).

Comme indiqué ci-avant, il est tout particulièrement avantageux d'associer le
5 gène suicide à un gène immunostimulant ou suppresseur de tumeurs. A cet égard, le
gène immunostimulant peut être tout gène dont le produit d'expression est capable de
stimuler les défenses de l'organisme. Préférentiellement, il s'agit d'un gène codant pour
une cytokine, telle que notamment une lymphokine (IL-1 à IL-12), un interféron
(alpha, bêta, etc), un facteur de nécrose des tumeurs, un facteur de stimulation des
10 colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, SCF, etc), etc. Encore plus préférentiellement, il
s'agit du gène codant pour l'interleukine-2 ou le GM-CSF. L'interleukine 2 est
synthétisée essentiellement par les lymphocytes, en réponse à la présence d'antigènes,
notamment d'antigènes tumoraux. Elle agit ensuite sur le développement de la réponse
immunitaire à l'encontre de ces antigènes, en particulier par activation locale des
15 cellules T cytotoxiques et tueuses (NK). Cette lymphokine joue ainsi un rôle important
dans l'immunité anti-tumorale. Grace aux vecteurs de la présente invention, il est
maintenant possible d'obtenir un effet antitumoral synergique résultant d'une
expression simultanée, dans la même cellule tumorale, de l'interleukine 2 et d'un gène
suicide, tel que le gène de la thymidine kinase.

20 Le GM-CSF est un facteur de stimulation des colonies de granulocytes et
macrophages. Il stimule donc la prolifération de ces cellules de l'immunité et permet
donc de renforcer les défenses immunitaires. Le gène et le cDNA du GM-CSF ont été
décrits dans la littérature. Sa co-expression dans un vecteur de l'invention avec un gène
suicide produit un effet synergique antitumoral élevé.

25 Parmi les gènes suppresseur de tumeurs utilisables dans le cadre de la
présente invention, on peut citer plus particulièrement les gènes p53, Rb, rap1A, DDC,
WAF et MTS. Plus particulièrement, on utilise le gène p53 ou le gène Rb.

Le gène p53 code pour une protéine nucléaire de 53 kDa. La forme mutée
30 par délétion et/ou mutation de ce gène est impliquée dans le développement de la
plupart des cancers humains (Baker et coll., Science 244 (1989) 217). Ses formes
mutées sont également capables de coopérer avec les oncogènes ras pour transformer
des fibroblastes murins. Le gène sauvage codant pour la p53 native inhibe en revanche
la formation des foyers de transformation dans des fibroblastes de rongeurs transfectés
35 avec diverses combinaisons d'oncogènes. Des données récentes soulignent que la

protéine p53 pourrait être elle-même un facteur de transcription et stimuler l'expression d'autres gènes suppresseurs de tumeur. Par ailleurs, un effet de p53 sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires a été mis en évidence récemment (Epstein et al. Science 151 (1994)).

5 Le gène Rb détermine la synthèse d'une phosphoprotéine nucléaire de 927 acides aminés environ (Friend et coll., Nature 323 (1986) 643) dont la fonction est de réprimer la division des cellules en les faisant entrer en phase de quiescence. Des formes inactivées du gène Rb ont été mises en cause dans différentes tumeurs, et notamment dans les rétinoblastomes ou dans les cancers mésenchymateux comme les
10 ostéosarcomes. La réintroduction de ce gène dans les cellules tumorales où il était inactivé produit un retour à l'état normal et une perte de la tumorigénicité (Huang et coll., Science 242 (1988) 1563). Récemment, il a été démontré que la protéine Rb normale, mais pas ses formes mutées, réprime l'expression du proto-oncogène c-fos, gène indispensable à la prolifération cellulaire.

15 Les gènes WAF et MTS et leurs propriétés antitumorales ont été décrits dans la littérature (Cell 75 (1993) 817; Science 264 (1994) 436).

20 Dans un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant un gène codant pour la thymidine kinase et un gène suppresseur de tumeurs. Plus préférentiellement, elle concerne un adénovirus comprenant un gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès et le gène p53 sauvage (Ad-TK-p53). De manière particulièrement
25 avantageuse, les deux gènes sont placés sous le contrôle de promoteurs séparés, de préférence le promoteur du LTR du virus HSV. Encore plus préférentiellement, les deux gènes sont insérés au niveau de la région E1 du génome de l'adénovirus.

30 Dans un autre mode particulièrement préféré de mise en oeuvre, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant un gène codant pour la thymidine kinase et un gène codant pour une lymphokine. Plus préférentiellement, elle concerne un adénovirus comprenant un gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès et un gène codant pour l'interleukine-2 (Ad-TK-IL2) ou pour le GM-CSF (Ad-TK-GM-CSF). De manière particulièrement avantageuse, les deux gènes sont placés sous le contrôle de promoteurs séparés, de préférence le promoteur du LTR du

virus HSV. Encore plus préférentiellement, les deux gènes sont insérés au niveau de la région E1 du génome de l'adénovirus.

Concernant les promoteurs transcriptionnels utilisés dans le cadre de la présente invention, il peut s'agir de promoteurs qui sont naturellement responsables de l'expression du gène thérapeutique considéré lorsque ceux-ci sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes mammifères, eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus déficient en aval d'une telle séquence. Un promoteur préféré pour la réalisation des vecteurs de l'invention est constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV). D'autres promoteurs particulièrement préférés sont les promoteurs spécifiques des cellules prolifératives ou cancéreuses. Ces promoteurs permettent en effet de cibler l'effet thérapeutique sur une population de cellule définie.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, il s'agit de signaux d'expression induits par ou actifs en présence de virus responsables ou associés à des tumeurs. Encore plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention un signal d'expression inductible par le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou par le virus du papillome.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé à deux types de cancers humains : le lymphome de Burkitt et le cancer du nasopharynx. L'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant un gène toxique sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'EBV permet avantageusement d'exprimer spécifiquement ce gène toxique dans les cellules tumorales du nasopharynx. Dans les biopsies de cancers du nasopharynx, un seul antigène nucléaire est régulièrement présent, EBNA1, qui est impliqué dans la maintenance du génome viral dans les cellules infectées par l'EBV en phase latente, et qui transactive le promoteur viral BCR2. Un objet particulier de l'invention réside donc dans l'utilisation, pour l'expression spécifique d'un gène dans les cellules de cancers du

nasopharynx, d'une séquence répondant à EBNA1 (EBNA1-RE : EBNA1 "responsive element"). En particulier, l'invention concerne un adénovirus comprenant comme signal d'expression un promoteur chimère comprenant une séquence répondant à EBNA1 fusionnée en amont d'un autre promoteur viral, le promoteur du gène de la terminale protéine 1 (TP1). Les exemples décrits dans la présente demande montrent bien que ce promoteur chimère est inductible par EBNA1.

Les virus du papillome (notamment le virus HPV 16 et 18) sont responsables de 90 % des cancers du cervix chez la femme et ont été identifiés dans des lésions épithéliales pré-cancéreuses (Riou et al., Lancet 335 (1990) 117). Le produit du gène E6 conduit à la formation de tumeurs en diminuant fortement la quantité de p53 sauvage, un anti-oncogène, dans les cellules HPV-positives (Wrede et al., Mol. Carcinog. 4 (1991) 171). L'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant un gène toxique sous le contrôle d'un promoteur inductible par le HPV (par exemple la protéine E6) permet avantageusement d'exprimer spécifiquement ce gène toxique dans les cellules tumorales correspondantes.

Il peut encore s'agir de signaux d'expression inactifs dans les cellules normales et actifs dans les cellules tumorales. En particulier, on peut utiliser dans le cadre de la présente invention le promoteur de l' α -foetoprotéine (Alpert E., dans Hepatocellular carcinoma, Okuda & Peters (eds), New York, 1976, 353) ou le promoteur P3 de l'IGF-II (Sussenbach et al., Growth Regulation 2 (1992) 1), qui sont actifs chez l'adulte, uniquement dans les hépatocarcinomes. Il est également possible d'utiliser des promoteurs induits par des hormones dans le cas de tumeurs hormono-dépendantes ou hormonales associées (tumeur du sein ou de la prostate par exemple).

Comme indiqué ci-avant, différentes configurations peuvent être envisagées pour la réalisation des vecteurs de l'invention. Les vecteurs de l'invention peuvent tout d'abord contenir les deux gènes sous forme d'une entité transcriptionnelle unique. Dans cette configuration, les deux gènes sont contigus, disposés sous le contrôle d'un promoteur unique, et donnent lieu à un ARN pré-messager unique. Cette configuration est avantageuse puisqu'elle permet d'utiliser un seul promoteur transcriptionnel pour réguler l'expression des 2 gènes. Par ailleurs, cette entité transcriptionnelle unique peut être incorporée dans le vecteur adénoviral dans les deux orientations possibles.

Les deux gènes peuvent également être placés sous le contrôle de promoteurs transcriptionnels séparés. Cette configuration permet d'obtenir des niveaux

d'expression supérieurs, et offre un meilleur contrôle de l'expression des gènes. Dans ce cas, les deux gènes thérapeutiques peuvent être insérés dans la même orientation ou dans les orientations opposées, dans un même site du génome de l'adénovirus ou en des sites différents.

5 Préférentiellement, les gènes sont insérés, au moins en partie, au niveau des régions E1, E3 ou E4 du génome de l'adénovirus. Lorsqu'ils sont insérés en deux sites différents, on préfère dans le cadre de l'invention utiliser les régions E1 et E3 ou E1 et E4. Un mode de réalisation particulièrement avantageux est celui dans lesquels deux gènes thérapeutiques sont insérés au niveau de la région E1. Les exemples montrent en
10 effet que cette organisation permet une expression élevée des deux gènes, sans interférence entre les deux. L'invention concerne donc également tout adénovirus recombinant comprenant deux gènes d'intérêt thérapeutique insérés au niveau de la région E1 du génome.

15 Par ailleurs, le gène immunostimulant peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit immunostimulant, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

20 Comme indiqué ci-avant, les adénovirus de la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs selon la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en
25 partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par les gènes thérapeutiques. Le caractère défectif des adénovirus de l'invention est un élément important, puisqu'il assure la non dissémination des vecteurs de l'invention après administration.

30 Dans un mode de réalisation préféré, les adénovirus de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et possèdent une délétion de tout ou partie du gène E1.

Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de réplication des adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est nécessaire à l'encapsidation de l'ADN viral. Cette région doit donc être présente pour permettre la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention. La séquence d'encapsidation est localisée dans le génome des adénovirus, entre l'ITR gauche (5') et le gène E1 (Cf figure 1). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence nucléotidiques de la séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence d'encapsidation correspond à la région comprenant les nucléotides 194 à 358 du génome.

Plus préférentiellement, les adénovirus de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et possèdent une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4.

Dans un mode particulièrement préféré de réalisation, le génome des adénovirus selon l'invention est délété de tout ou partie des gènes E1, E3 et E4, et, encore plus préférentiellement, de tout ou partie des gènes E1, E3, L5 et E4.

Les adénovirus de l'invention peuvent être préparés à partir d'adénovirus d'origines diverses. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Ainsi, les enseignements décrits dans la présente demande peuvent être aisément reproduits par l'homme du métier pour tout type d'adénovirus.

Plus particulièrement, les adénovirus de l'invention peuvent être d'origine humaine, animale, ou mixte (humaine et animale).

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on préfère utiliser ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

5 Comme indiqué plus haut, les adénovirus de l'invention peuvent également être d'origine animale, ou comporter des séquences issues d'adénovirus d'origine animale. La demanderesse a en effet montré que les adénovirus d'origine animale sont capables d'infecter avec une grande efficacité les cellules humaines, et qu'ils sont incapables de se propager dans les cellules humaines dans lesquelles ils ont été testés
10 (Cf demande FR 93 05954). La demanderesse a également montré que les adénovirus d'origine animale ne sont nullement trans-complémentés par des adénovirus d'origine humaine, ce qui élimine tout risque de recombinaison et de propagation in vivo, en présence d'un adénovirus humain, pouvant conduire à la formation d'une particule infectieuse. L'utilisation d'adénovirus ou de régions d'adénovirus d'origine animale est
15 donc particulièrement avantageuse puisque les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique sont encore plus faibles.

Les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV).
20 Plus particulièrement, parmi les adénovirus aviaires, on peut citer les sérotypes 1 à 10 accessibles à l'ATCC, comme par exemple les souches Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou encore les souches référencées ATCC VR-831 à 835. Parmi les adénovirus bovins, on peut
25 utiliser les différents sérotypes connus, et notamment ceux disponibles à l'ATCC (types 1 à 8) sous les références ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 et 769. On peut également citer les adénovirus murins FL (ATCC VR-550) et E20308 (ATCC VR-528), l'adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343), ou type 6 (ATCC VR-1340); l'adénovirus porcin 5359), ou les adénovirus simiens tels que notamment les
30 adénovirus référencée à l'ATCC sous les numéros VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De préférence, parmi les différents adénovirus d'origine animale, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus ou des régions d'adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou
35 A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Les adénovirus canins ont fait l'objet de

nombreuses études structurales. Ainsi, des cartes de restriction complètes des
adénovirus CAV1 et CAV2 ont été décrites dans l'art antérieur (Spibey et al., J. Gen.
Virol. 70 (1989) 165), et les gènes E1a, E3 ainsi que les séquences ITR ont été clonés
et séquencés (voir notamment Spibey et al., Virus Res. 14 (1989) 241; Linné, Virus
5 Res. 23 (1992) 119, WO 91/11525).

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés
de différentes façons.

Une première méthode consiste à transfecter l'ADN du virus recombinant
défectif préparé in vitro (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) dans une lignée
10 cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la
complémentation du virus défectif. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées
dans le génome de la cellule, ce qui permet d'éviter les risques de recombinaison, et
confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire.

Une seconde approche consiste à co-transfecter dans une lignée cellulaire
15 appropriée l'ADN du virus recombinant défectif préparé in vitro (soit par ligature,
soit sous forme de plasmide) et l'ADN d'un virus helper. Selon cette méthode, il n'est
pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de compléter
toutes les fonctions défectives de l'adénovirus recombinant. Une partie de ces
fonctions est en effet complémentée par le virus helper. Ce virus helper doit lui-même
20 être défectif et la lignée cellulaire porte en trans les fonctions nécessaires à sa
complémentation. Parmi les lignées cellulaires utilisables notamment dans le cadre de
cette seconde approche, on peut citer notamment la lignée de rein embryonnaire
humain 293, les cellules KB, les cellules Hela, MDCK, GHK, etc (Cf exemples).

Ensuite, les vecteurs qui se sont multipliés sont récupérés, purifiés et
25 amplifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

Selon une variante de mise en oeuvre, il est possible de préparer in vitro, soit
par ligature, soit sous forme de plasmide, l'ADN du virus recombinant défectif portant
les délétions appropriées et les deux gènes thérapeutiques. Comme indiqué ci-avant,
30 les vecteurs de l'invention possèdent avantageusement une délétion de tout ou partie
de certains gènes viraux, notamment des gènes E1, E3, E4 et/ou L5. Cette délétion
peut correspondre à tout type de suppression affectant le gène considéré. Il peut s'agir
notamment de la suppression de tout ou partie de la région codante dudit gène, et/ou
de tout ou partie de la région promotrice de la transcription dudit gène. La suppression
35 est généralement réalisée sur l'ADN du virus recombinant défectif, par exemple par

digestion au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques de biologie moléculaire, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les gènes thérapeutiques peuvent ensuite être insérés dans cet ADN par clivage enzymatique puis ligature, au niveau des régions sélectionnées et dans l'orientation choisie.

5 L'ADN ainsi obtenu, qui porte donc les délétions appropriées et les deux gènes thérapeutiques, permet de générer directement l'adénovirus recombinant défectif portant lesdites délétions et gènes thérapeutiques. Cette première variante est particulièrement adaptée à la réalisation d'adénovirus recombinants dans lesquels les gènes thérapeutiques sont disposés sous forme d'une unité transcriptionnelle unique
10 ou, sous contrôle de promoteurs séparés mais insérés en un même site du génome.

Il est également possible de préparer le virus recombinant en deux étapes, permettant l'introduction successive des deux gènes thérapeutiques. Ainsi, l'ADN d'un premier virus recombinant portant les délétions appropriées (ou une partie desdites
15 délétions) et un des gènes thérapeutiques est construit, par ligature ou sous forme de plasmide. Cet ADN est ensuite utilisé pour générer un premier virus recombinant portant lesdites délétions et un gène thérapeutique. L'ADN de ce premier virus est ensuite isolé et co-transfecté avec un second plasmide ou l'ADN d'un second virus recombinant défectif portant le deuxième gène thérapeutique, les délétions appropriées
20 (partie non présente sur le premier virus), et une région permettant la recombinaison homologue. Cette deuxième étape génère ainsi le virus recombinant défectif portant les deux gènes thérapeutiques. Cette variante de préparation est particulièrement appropriée pour la préparation de virus recombinants portant deux gènes thérapeutiques insérés en deux régions différentes du génome de l'adénovirus.

25 La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

30 Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition

selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies. Ils sont particulièrement avantageux pour le traitement des pathologies hyperprolifératives (cancers, resténose, etc), par injection directe au niveau du site concerné. A cet égard, la présente invention concerne également une méthode pour la destruction de cellules prolifératives comprenant l'infection desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec un vecteur adénoviral tel que défini ci-dessus. Dans le cas où le gène suicide est un gène conférant une sensibilité à un agent thérapeutique, la méthode de destruction selon l'invention comprend ensuite le traitement des cellules par ledit agent thérapeutique. Pour la mise en oeuvre de cette méthode, l'invention a également pour objet les produits comprenant un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant dans lequel le gène suicide est un gène conférant une sensibilité à un agent thérapeutique; et ledit agent thérapeutique, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des pathologies hyperprolifératives. Plus particulièrement, le gène suicide est un gène thymidine kinase et l'agent thérapeutique est le gancyclovir ou l'acyclovir ou un analogue.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

Figure 2 : Carte de restriction de l'adénovirus CAV2 souche Manhattan (d'après Spibey et al précité).

Figure 3 : Représentation du vecteur pONTtk

Figure 4 : Représentation du vecteur pRSVtk

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les
5 spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Lignées cellulaires utilisées

10 Dans les exemples qui suivent, les lignées cellulaires suivantes ont ou peuvent être utilisées :

- Lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %).

15 - Lignée de cellules humaines KB : Issue d'un carcinome épidermique humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant sa culture.

- Lignée de cellules humaines Hela : Issue d'un carcinome de l'épithélium humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions
20 permettant sa culture.

- Lignée de cellules canines MDCK : Les conditions de culture des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.

- Lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624). Cette lignée est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le
25 contrôle du LTR de MMTV.

EXEMPLES

Exemple 1. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant le gène TK sous le contrôle d'un promoteur cancer-spécifique et le gène p53 sous le contrôle du promoteur CMV.

30 Ces adénovirus ont été construits par recombinaison homologue entre un plasmide portant la partie gauche de l'adénovirus Ad5, les deux gènes thérapeutiques

et une région de l'adénovirus Ad5. (correspondant à la protéine IX) et l'ADN d'un adénovirus défectif portant différentes délétions.

1. Construction du vecteur pONT-tk

1.1. Construction du plasmide p7tk1

5 Cet exemple décrit la construction du plasmide p7tk1 contenant la phase ouverte de lecture du gène tk de 1131 paires de bases (ATG 114-116 et codon stop TGA 1242-1244), insérée dans un multisite de clonage.

Le fragment BgIII-NcoI contenant le gène de la thymidine kinase (tk) du virus herpès simplex type 1 a été isolé à partir du plasmide pHSV-106 (commercialisé
10 par Gibco BRL), réparé par l'action du fragment klenow puis inséré au site SmaI du plasmide pGEM7zf(+) (commercialisé par Promega). Les sites SmaI et BgIII sont détruits lors de cette étape, le site NcoI est conservé.

Le plasmide obtenu a été désigné p7tk1.

15 1.2. Construction du plasmide pONT1

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un promoteur chimère constitué d'une séquence nécessaire à la transactivation par l'antigène EBNA1 et du promoteur TP1 du virus EBV.

Le fragment EcoRI(7315)-SmaI(8191) du virus EBV a été isolé à partir de la
20 souche B95-8. La séquence complète du virus EBV a été décrite par Baer et al. (Nature 310 (1984) 207). Ce fragment contient les séquences nécessaires à la transactivation par l'antigène nucléaire 1 (EBNA1) (D. Reisman & B. Sugden, 1986, Molecular and Cellular Biology, vol. 6 pp. 3838-3846). Ce fragment a ensuite été fusionné au fragment NruI(166 241)-PstI(166 559) de l'EBV B95-8 (le site PstI a été
25 digéré par la polymérase T4), contenant le promoteur TP1. Le promoteur chimère ainsi obtenu a ensuite été inséré dans le multisite de clonage du plasmide pBluescript II SK.

Le plasmide obtenu a été désigné pONT1.

1.3. Construction du plasmide pONTtk

30 Le plasmide pONTtk comporte le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) cloné dans le plasmide p7tk1, sous le contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 cloné dans le plasmide pONT1.

Pour construire ce plasmide, le fragment BamHI-XhoI de pONT1 qui contient le promoteur chimère transactivé par EBNA-1 et EBNA-2, et le fragment XhoI-ClaI de p7tk1 qui contient la phase ouverte de lecture de tk ont été clonés aux sites BamHI (478) et ClaI (4550) du plasmide pAd.RSV β gal. Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'→3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;
 - le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),
 - un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le plasmide pAd.RSV β Gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).
- Tous les sites de clonage sont conservés. Le plasmide obtenu a été désigné pONTtk (figure 3).

2. Construction du plasmide pONTtkCMVp53

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur portant la partie gauche de l'adénovirus Ad5 (comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation et le début de la région E1), le gène tk sous contrôle du promoteur ONT, le gène p53 sous contrôle du promoteur CMV et un second fragment du génome de l'Ad5 (protéine pIX) permettant la recombinaison homologue en vue de la génération de l'adénovirus recombinant (Cf exemple 1.3.).

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk, par insertion, en aval du gène tk et dans la même orientation, d'un fragment portant le gène p53 sous contrôle du promoteur CMV et suivi du site de polyadénylation du virus SV40. Plus précisément, le fragment inséré comprend :

- une région promotrice d'origine virale qui correspond au promoteur précoce du cytomégalo virus (CMV). Cette région est entourée dans le vecteur de sites de restrictions uniques EcoRI-SphI à la jonction CMV/pONTtk et BamHI à la jonction CMV / p53. La présence de sites uniques flanquant la région promotrice permet de remplacer la région CMV par tout autre promoteur. Une deuxième série de vecteurs

est ainsi obtenue dans laquelle le gène p53 est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible : le promoteur de la metallothionine, inductible par les métaux lourds (cadmium et zinc).

- une séquence de 1173 pb correspondant à l'ADNc codant pour la protéine p53 de souris sous sa forme sauvage (Zakut-Houri et al., Nature 36 (1983) 594). Dans cette construction, le gène suppresseur est sous forme d'ADNc, c'est-à-dire dépourvue d'introns. Ceci permet notamment de réduire la taille du vecteur. Par ailleurs, il a été vérifié que les niveaux d'expression obtenus sont comparables en présence ou en l'absence d'introns.
- le signal de polyadénylation des gènes tardifs du virus SV40, qui correspond à un signal de polyadénylation très efficace. Deux sites de restriction uniques Sall et HindIII sont situés en aval du signal de polyadénylation.

Le vecteur obtenu a été désigné pONTtkCMVp53.

- Il est entendu que l'insertion dudit fragment peut être effectuée de manière similaire dans l'orientation inverse, conduisant à un plasmide dans lequel le gène tk et le gène p53 sont dans les orientations opposées (pONTtkCMVp53inv).

3. Construction des adénovirus recombinants

- 3.1. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans la région E1, portant les deux gènes thérapeutiques insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1.

- Le vecteur pONTtkCMVp53 a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient dans le gène E1, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

- Plus précisément, l'adénovirus Ad-ONTtkCMVp53,ΔE1 est obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus Ad-RSVβgal (Cf Stratford-Perricaudet et al citée plus haut) et le vecteur pONTtkCMVp53, selon le protocole suivant : le plasmide pONTtkCMVp53, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-RSVβgal, linéarisé par l'enzyme ClaI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont ensuite sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée

cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-ONT-tkCMVp53, Δ E1 peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

3.2. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans la région E1 et E3, portant les deux gènes thérapeutiques insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1.

Le vecteur pONTtkCMVp53 a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient dans les gènes E1 et E3, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-ONTtkCMVp53, Δ E1, Δ E3 est obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pONTtkCMVp53, selon le protocole suivant : le plasmide pONTtkCMVp53, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont ensuite sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-ONT-tkCMVp53, Δ E1, Δ E3 peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

3.3. Construction d'adénovirus dans lesquels les gènes tk et p53 sont positionnés dans les orientations opposées.

En suivant les protocoles décrits dans les exemples 3.1. et 3.2. ci-dessus, des adénovirus dans lesquels les gènes tk et p53 sont positionnés dans les orientations opposées peuvent être construits en partant du plasmide pONTtkCMVp53inv.

Exemple 2. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant le gène TK sous le contrôle du promoteur du LTR du virus RSV et le gène p53 sous le contrôle du promoteur CMV.

Ces adénovirus ont été construits par recombinaison homologue entre un
5 plasmide portant la partie gauche de l'adénovirus Ad5, les deux gènes thérapeutiques
et une région de l'adénovirus Ad5 (correspondant à la protéine IX) et l'ADN d'un
adénovirus défectif portant différentes délétions.

1. Construction du vecteur pRSVtk

10 Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk (exemple 1.1), par
substitution du promoteur transactivable par EBNA1 par le promoteur du LTR du
RSV. Pour cela, le promoteur RSV a été isolé sous forme d'un fragment BamHI-Sall à
partir du plasmide pAd.RSV.βgal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90
(1992) 626), puis cloné aux sites BamHI(478) et Sall(1700) du plasmide pONTtk. Le
15 plasmide résultant a été désigné pRSVtk (figure 4).

2. Construction du plasmide pRSVtkCMVp53

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur portant la partie gauche de
l'adénovirus Ad5 (comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation et le début de la
20 région E1), le gène tk sous contrôle du promoteur RSV, le gène p53 sous contrôle du
promoteur CMV et un second fragment du génome de l'Ad5 (protéine pIX)
permettant la recombinaison homologue en vue de la génération de l'adénovirus
recombinant (Cf exemple 2.3.).

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pRSVtk, par insertion, en
25 aval du gène tk, d'un fragment portant le gène p53 sous contrôle du promoteur CMV
et suivi du site de polyadénylation du virus SV40. Plus précisément, le fragment inséré
comprend :

- une région promotrice d'origine virale qui correspond au promoteur précoce
du cytomégalovirus (CMV). Cette région est entourée dans le vecteur de sites de
30 restrictions uniques EcoRI-SphI à la jonction CMV/pONTtk et BamHI à la jonction
CMV / p53. La présence de sites uniques flanquant la région promotrice permet
de remplacer la région CMV par tout autre promoteur. Une deuxième série de vecteurs

est ainsi obtenue dans laquelle le gène p53 est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible : le promoteur de la metallothionine, inductible par les métaux lourds (cadmium et zinc).

5 - une séquence de 1173 pb correspondant à l'ADNc codant pour la protéine p53 de souris sous sa forme sauvage (Zakut-Houri et al., Nature 36 (1983) 594). Dans cette construction, le gène suppresseur est sous forme d'ADNc, c'est-à-dire dépourvue d'introns. Ceci permet notamment de réduire la taille du vecteur. Par ailleurs, il a été vérifié que les niveaux d'expression obtenus sont comparables en présence ou en l'absence d'introns.

10 - le signal de polyadénylation des gènes tardifs du virus SV40, qui correspond à un signal de polyadénylation très efficace. Deux sites de restriction uniques SalI et HindIII sont situés en aval du signal de polyadénylation.

Le vecteur obtenu a été désigné pRSVtkCMVp53.

15 3. Construction des adénovirus recombinants

3.1. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans la région E1, portant les deux gènes thérapeutiques insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1.

20 Cet adénovirus est construit selon le protocole décrit dans l'exemple 1(3.1.). L'adénovirus Ad-RSV-tkCMVp53,ΔE1 ainsi obtenu peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

3.2. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans les régions E1 et E3, portant les deux gènes thérapeutiques insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1.

Cet adénovirus est construit selon le protocole décrit dans l'exemple 1(3.2.). L'adénovirus Ad-RSV-tkCMVp53,ΔE1,ΔE3 ainsi obtenu peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

30 **Exemple 3. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant le gène TK sous le contrôle du promoteur du LTR du virus RSV et le gène de l'interleukine-2 sous le contrôle du même promoteur.**

Ces adénovirus ont été construits par recombinaison homologue entre un plasmide portant la partie gauche de l'adénovirus Ad5, les deux gènes thérapeutiques et une région de l'adénovirus Ad5 (correspondant à la protéine IX) et l'ADN d'un adénovirus défectif portant différentes délétions.

5 1. Construction du plasmide pRSVtkRSVIL-2

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur portant la partie gauche de l'adénovirus Ad5 (comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation et le début de la région E1), le gène tk sous contrôle du promoteur RSV, le gène de l'interleukine-2 sous contrôle du promoteur RSV et un second fragment du génome de l'Ad5 (protéine pIX) permettant la recombinaison homologue en vue de la génération de l'adénovirus recombinaut (Cf exemple 3.2.).

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pRSVtk (Cf exemple2), par insertion, en aval du gène tk, d'un fragment portant le gène de l'interleukine-2 sous contrôle du promoteur RSV et suivi du site de polyadénylation du virus SV40. Plus

15 précisément, le fragment inséré comprend :

- le promoteur du LTR du virus RSV, isolé sous forme d'un fragment BamHI-Sall à partir du plasmide pAd.RSV.βgal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626);
- une séquence correspondant à l'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine
- 20 (EP91 539). Dans cette construction, le gène thérapeutique est sous forme d'ADNc.
- le signal de polyadénylation des gènes tardifs du virus SV40, qui correspond à un signal de polyadénylation très efficace. Deux sites de restriction uniques Sall et HindIII sont situés en aval du signal de polyadénylation.

Le vecteur obtenu a été désigné pRSVtkRSVIL-2.

25

2. Construction des adénovirus recombinants

Deux types d'adénovirus recombinants sont construits selon le protocole décrit dans l'exemple 1 ou 2. Ces adénovirus portent les deux gènes thérapeutiques

30 insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1 et présentent une délétion dans la région E1 ou dans les régions E1 et E3.

Les adénovirus Ad-RSV-tkRSVIL-2,ΔE1 et Ad-RSV-tkRSVIL-2,ΔE1,ΔE3 ainsi obtenus peuvent être conservés à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 4. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant le gène TK et le gène codant pour le facteur de stimulation des colonies de granocytes et macrophages (GM-CSF).

En suivant les protocoles décrits dans les exemples précédents, des adénovirus défectifs portant le gène tk (sous contrôle du promoteur ONT ou RSV par exemple) et le gène du GM-CSF sous contrôle de son propre promoteur ou du promoteur RSV notamment peuvent être construits.

Pour cela, un vecteur intermédiaire portant les deux gènes peut être construit à partir du vecteur pONTtk ou pRSVtk par insertion, dans la même orientation ou dans l'orientation inverse, d'un fragment portant le gène du GM-CSF sous contrôle du promoteur. Le gène codant pour le GM-CSF et des constructions le contenant ont été décrits notamment dans la demande WO86/03225.

Exemple 5. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant deux gènes d'intérêt, l'un inséré au niveau de la région E1 et l'autre inséré au niveau de la région E3.

Ces adénovirus sont construits par recombinaison homologue entre un l'ADN d'un premier virus défectif portant le premier gène inséré au niveau de la région E1 et l'ADN d'un deuxième adénovirus défectif portant le deuxième gène inséré au niveau de la région E3.

1. Construction du virus défectif portant le gène inséré au niveau de la région E3

Ce virus est construit à partir de l'adénovirus Addl324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543). Ce virus porte une délétion au niveau de la région E1 et E3 (fragment XbaI-EcoRI délété). L'ADN du virus Addl324 a été isolé et purifié. Cet ADN est ensuite coupé par les enzymes XbaI et EcoRI. Un fragment XbaI-EcoRI est ensuite issu du plasmide pRSVtk portant la séquence codant pour la thymidine kinase sous contrôle du promoteur RSV, puis inséré au niveau des sites dans l'ADN de Addl324 ouvert comme précédemment.

L'ADN ainsi obtenu comporte donc une délétion au niveau de la région E1 et le gène TK inséré au niveau de la région E3.

2. Construction des adénovirus portant les deux gènes.

5 L'ADN du virus recombinant préparé ci-dessus et l'ADN d'un adénovirus recombinant portant un gène immunostimulant ou suppresseur de tumeurs inséré au niveau de la région E1, linéarisé par BamHI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont ensuite sélectionnés par purification sur
10 plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham
15 et al., Virology 52 (1973) 456).

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend deux gènes thérapeutiques, le premier étant un gène suicide et le second un gène immunostimulant ou un gène suppresseur de tumeurs.

2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que les deux gènes constituent une entité transcriptionnelle unique sous le contrôle d'un promoteur unique.

3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que les deux gènes sont sous le contrôle de promoteurs transcriptionnels séparés.

4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que les deux gènes sont insérés dans la même orientation.

5. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que les deux gènes sont insérés dans les orientations opposées.

6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que les deux gènes thérapeutiques sont insérés dans un même site du génome, de préférence au niveau des régions E1, E3 ou E4.

7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les deux gènes sont insérés au niveau de la région E1.

8. Adénovirus selon l'une des revendications 1, 3, 4 et 5 caractérisé en ce que les deux gènes thérapeutiques sont insérés en des sites différents du génome.

9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'un des gènes est inséré au niveau de la région E1 et l'autre au niveau de la région E3 ou E4.

10. Adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, et en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4.

11. Adénovirus selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, et en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie des gènes E1, E3 et E4.

12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce que son
5 génome est délété de tout ou partie des gènes E1, E3, L5 et E4.

13. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est d'origine humaine, animale, ou mixte.

14. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine humaine sont choisis parmi ceux classés dans le groupe C, de préférence
10 parmi les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

15. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine animale sont choisis parmi les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviaire et simienne.

16. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que le gène suicide est un gène de la thymidine kinase, de préférence le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès HSV-I.

17. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend un
20 gène codant pour la thymidine kinase et un gène suppresseur de tumeurs.

18. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour la thymidine kinase et un gène codant pour une lymphokine.

25 19. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès et le gène p53 sauvage (Ad-TK-p53).

30 20. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès et un gène codant pour l'interleukine-2 (Ad-TK-IL2).

21. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès et un gène codant pour le GM-CSF (Ad-TK-GM-CSF).
22. Adénovirus selon les revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que le ou les promoteurs transcriptionnels sont choisis parmi les promoteurs mammifères, eucaryotes ou viraux.
23. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le gène immunostimulant comporte une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible.
24. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 23.
25. Composition pharmaceutique selon la revendication 24 comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
26. Produits comprenant :
- un ou plusieurs adénovirus recombinants tels que définis dans les revendication 1 à 23 dans lequel le gène suicide est un gène conférant une sensibilité à un agent thérapeutique, et,
 - ledit agent thérapeutique
- comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des pathologies hyperprolifératives.
27. Produits selon la revendication 26 caractérisé en ce que le gène suicide est un gène thymidine kinase et l'agent thérapeutique est le gancyclovir ou l'acyclovir ou un analogue.
28. Adénovirus recombinant défectif comprenant deux gènes d'intérêt thérapeutique insérés au niveau de la région E1 du génome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/01274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/55 C07K14/535 C07K14/035
C07K14/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CANCER GENE THERAPY, vol.1, no.2, 4 pages 107 - 112 SHEWACH, D. S. ET AL. 'Enhanced cytotoxicity of antiviral drugs mediated by adenovirus directed transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in glioma cells' see the whole document ---	1-27
Y	WO,A,93 21959 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, THE USA) 11 November 1993 see claims 1,4-15,18-24,26 ---	1-27
Y	WO,A,93 10218 (THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 27 May 1993 see claims 1,2,4-11 ---	1-27
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 1996

Date of mailing of the international search report

12.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HF Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

CHAM BONNET, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01274

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol.SUPPL, no.18C, 13 February 1994 page 204 WILLS, K.N. ET AL. 'Tumor suppressor gene therapy of cancer. Adenoviral mediated gene transfer of p53 and retinoblastoma cDNA into human tumor cell lines' * Résumé N 524 *	1-17,19, 22-27
Y	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.91, no.8, 4, WASHINGTON US pages 3054 - 3057 CHEN, S.H. ET AL. 'Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo' see the whole document	1-27
Y	--- FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 September 1993 see page 1, line 20 - page 3, line 27; claim 6; figure 1	1-16,18, 20-27
P,Y	--- FR,A,2 707 664 (CNRS. INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 20 January 1995 see page 2, line 30 - line 34 see page 5, line 31 - page 6, line 24; claims 9,10	1-27
P,X	--- WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER) 27 October 1994 see claims 1-5,9-16	1-17,19, 22-27
P,Y	--- WO,A,94 26914 (RHONE-POULENC RORER) 24 November 1994 see page 3, line 27 - page 5, line 12; claims 10-18	1-27
P,X	--- WO,A,95 00655 (MC MASTER UNIVERSITY) 5 January 1995 see page 4, line 11 - page 6, line 14 see page 23, line 14 - page 27, line 16; claim 14; figures 7,8	1-27
P,Y	--- WO,A,95 14102 (RHONE-POULENC RORER) 26 May 1995 see the whole document	1
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01274

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CANCER GENE THERAPY, vol.1, no.1, 4 pages 5 - 13 ZHANG, W.W. ET AL. 'High-efficiency gene transfer and high level expression of wild type p53 in human cancer cells mediated by recombinant adenovirus' see page 12, column 2, line 17 - line 18 ---</p>	1
A	<p>WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 June 1994 see figure 32 ---</p>	1
P,Y	<p>WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 December 1994 see page 30, line 1 - line 25 see page 18, line 26 - page 19, line 5 see page 11, line 4 - page 12, line 17; claims ---</p>	1
Y	<p>WO,A,88 00971 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 11 February 1988 see page 8, line 20 - page 9, line 3; claims; figures 1-4; example 1 ---</p>	1
P,Y	<p>GENE THERAPY, vol.2, no.4, 5 pages 256 - 262 LEE, M.G. ET AL. 'The constitutive expression of the immunomodulatory gp 19k protein in E1-, E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against vector' see the whole document ---</p>	1
A	<p>VIROLOGY, vol.175, no.2, pages 535 - 547 CHANDA, P.K. ET AL. 'High level expression of the envelope glycoproteins of the Human Immunodeficiency Virus Type I in presence of rev gene using helper-independent adenovirus type 7 recombinants' see the whole document -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/01274

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- claims 1-27
- claim 28

see additional sheet PCT/ISA/210

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-27

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/01274

1. Claims 1-27:
definitive recombinant adenovirus characterized in that it comprises two therapeutic genes, the first being a suicide gene and the second an immunostimulant gene or a tumor suppressor gene, and pharmaceutical preparations containing it.
2. Claim 28:
defective recombinant adenovirus comprising two genes of therapeutic interest inserted at the level of the E1 region of the genome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9321959	11-11-93	AU-B- 4221793 CA-A- 2134763 EP-A- 0637966 JP-T- 7506370	29-11-93 11-11-93 15-02-95 13-07-95
WO-A-9310218	27-05-93	NONE	
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093 CA-A- 2102302 EP-A- 0593755 WO-A- 9319191 HU-A- 66486 JP-T- 6508039 NO-A- 934061	21-10-93 17-09-93 27-04-94 30-09-93 28-11-94 14-09-94 09-11-93
FR-A-2707664	20-01-95	AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 WO-A- 9502697 NO-A- 950939 PL-A- 308122	13-02-95 26-01-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 26-01-95 10-03-95 24-07-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234 AU-B- 6572194 CA-A- 2158869 EP-A- 0695360 FI-A- 954966 NO-A- 954132	28-10-94 08-11-94 27-10-94 07-02-96 18-10-95 17-10-95
WO-A-9426914	24-11-94	FR-A- 2705361 AU-B- 6787894 CA-A- 2163256 EP-A- 0698108 FI-A- 955552 NO-A- 954466	25-11-94 12-12-94 24-11-94 28-02-96 27-12-95 07-11-95
WO-A-9500655	05-01-95	AU-B- 7118494	17-01-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9514102	26-05-95	FR-A- 2712603 AU-B- 8147294	24-05-95 06-06-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994 CA-A- 2145641 EP-A- 0673431	22-06-94 09-06-94 27-09-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686 AU-B- 6850394 CA-A- 2141212 EP-A- 0652968 JP-T- 7509616	02-12-94 20-12-94 08-12-94 17-05-95 26-10-95
WO-A-8800971	11-02-88	AT-T- 132534 AU-B- 612983 AU-B- 7789987 DE-D- 3751664 EP-A- 0275300 JP-T- 1500755	15-01-96 25-07-91 24-02-88 15-02-96 27-07-88 16-03-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. : Internationale No
PCT/FR 95/01274

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/55 C07K14/535 C07K14/035 C07K14/82		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CANCER GENE THERAPY, vol.1, no.2, 4 pages 107 - 112 SHEWACH, D. S. ET AL. 'Enhanced cytotoxicity of antiviral drugs mediated by adenovirus directed transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in glioma cells' voir le document en entier ---	1-27
Y	WO,A,93 21959 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, THE USA) 11 Novembre 1993 voir revendications 1,4-15,18-24,26 ---	1-27
Y	WO,A,93 10218 (THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 27 Mai 1993 voir revendications 1,2,4-11 ---	1-27
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">6 Février 1996</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12.03.96</div>	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5812 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">CHAMBONNET, F</div>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière Internationale No
PC1/FR 95/01274

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. SUPPL. no.18C, 13 Février 1994 page 204 WILLS, K.N. ET AL. 'Tumor suppressor gene therapy of cancer. Adenoviral mediated gene transfer of p53 and retinoblastoma cDNA into human tumor cell lines' * Résumé N 524 *	1-17,19, 22-27
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.91, no.8, 4, WASHINGTON US pages 3054 - 3057 CHEN, S.H. ET AL. 'Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo' voir le document en entier	1-27
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 Septembre 1993 voir page 1, ligne 20 - page 3, ligne 27; revendication 6; figure 1	1-16,18, 20-27
P,Y	FR,A,2 707 664 (CNRS. INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 20 Janvier 1995 voir page 2, ligne 30 - ligne 34 voir page 5, ligne 31 - page 6, ligne 24; revendications 9,10	1-27
P,X	WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER) 27 Octobre 1994 voir revendications 1-5,9-16	1-17,19, 22-27
P,Y	WO,A,94 26914 (RHONE-POULENC RORER) 24 Novembre 1994 voir page 3, ligne 27 - page 5, ligne 12; revendications 10-18	1-27
P,X	WO,A,95 00655 (MC MASTER UNIVERSITY) 5 Janvier 1995 voir page 4, ligne 11 - page 6, ligne 14 voir page 23, ligne 14 - page 27, ligne 16; revendication 14; figures 7,8	1-27
P,Y	WO,A,95 14102 (RHONE-POULENC RORER) 26 Mai 1995 voir le document en entier	1

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No
PCT/FR 95/01274

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CANCER GENE THERAPY, vol.1, no.1, 4 pages 5 - 13 ZHANG, W.W. ET AL. 'High-efficiency gene transfer and high level expression of wild type p53 in human cancer cells mediated by recombinant adenovirus' voir page 12, colonne 2, ligne 17 - ligne 18 ---</p>	1
A	<p>WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 Juin 1994 voir figure 32 ---</p>	1
P,Y	<p>WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 Décembre 1994 voir page 30, ligne 1 - ligne 25 voir page 18, ligne 26 - page 19, ligne 5 voir page 11, ligne 4 - page 12, ligne 17; revendications ---</p>	1
Y	<p>WO,A,88 00971 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 11 Février 1988 voir page 8, ligne 20 - page 9, ligne 3; revendications; figures 1-4; exemple 1 ---</p>	1
P,Y	<p>GENE THERAPY, vol.2, no.4, 5 pages 256 - 262 LEE, M.G. ET AL. 'The constitutive expression of the immunomodulatory gp 19k protein in E1-, E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against vector' voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>VIROLOGY, vol.175, no.2, pages 535 - 547 CHANDA, P.K. ET AL. 'High level expression of the envelope glycoproteins of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in presence of rev gene using helper-independent adenovirus type 7 recombinants' voir le document en entier -----</p>	1

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

- revendications 1-27
- revendication 28

Voir feuille additionnelle PCT/ISA/210

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:
1-27.

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR PCT/ISA/210

1. revendications 1-27:

Adénovirus recombinant définitif caractérisé en ce qu'il comprend deux gènes thérapeutiques, le premier étant du gène suicide et le second un gène immunostimulant ou un gène suppresseur de tumeurs, et compositions pharmaceutiques le contenant.

2. revendication 28:

Adénovirus recombinant défectif comprenant deux gènes d'intérêt thérapeutiques insérés au niveau de la région E1 du génome.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au : Membres de familles de brevets

Dem : Internationale No

PCT/FR 95/01274

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9321959	11-11-93	AU-B- 4221793 CA-A- 2134763 EP-A- 0637966 JP-T- 7506370	29-11-93 11-11-93 15-02-95 13-07-95
WO-A-9310218	27-05-93	AUCUN	
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093 CA-A- 2102302 EP-A- 0593755 WO-A- 9319191 HU-A- 66486 JP-T- 6508039 NO-A- 934061	21-10-93 17-09-93 27-04-94 30-09-93 28-11-94 14-09-94 09-11-93
FR-A-2707664	20-01-95	AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 WO-A- 9502697 NO-A- 950939 PL-A- 308122	13-02-95 26-01-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 26-01-95 10-03-95 24-07-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234 AU-B- 6572194 CA-A- 2158869 EP-A- 0695360 FI-A- 954966 NO-A- 954132	28-10-94 08-11-94 27-10-94 07-02-96 18-10-95 17-10-95
WO-A-9426914	24-11-94	FR-A- 2705361 AU-B- 6787894 CA-A- 2163256 EP-A- 0698108 FI-A- 955552 NO-A- 954466	25-11-94 12-12-94 24-11-94 28-02-96 27-12-95 07-11-95
WO-A-9500655	05-01-95	AU-B- 7118494	17-01-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc : Internationale No
PCT/FR 95/01274

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9514102	26-05-95	FR-A- 2712603	24-05-95
		AU-B- 8147294	06-06-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994	22-06-94
		CA-A- 2145641	09-06-94
		EP-A- 0673431	27-09-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
WO-A-8800971	11-02-88	AT-T- 132534	15-01-96
		AU-B- 612983	25-07-91
		AU-B- 7789987	24-02-88
		DE-D- 3751664	15-02-96
		EP-A- 0275300	27-07-88
		JP-T- 1500755	16-03-89